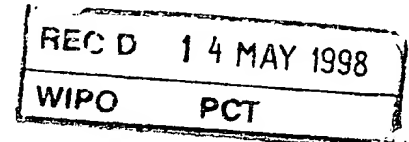


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Bescheinigung

**PRIORITY DOCUMENT**

Die Bundesrepublik Deutschland ~~letztervertreten~~ durch den  
Präsidenten des Paul-Ehrlich Instituts Prof. Dr. R. Kurth  
in Langen in Hessen/Deutschland hat eine Patentanmeldung  
unter der Bezeichnung

"Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstel-  
lung und ihre Verwendung zur Genübertragung in  
CD4-positive Zellen"

am 27. Februar 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue  
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-  
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die  
Symbole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patent-  
klassifikation erhalten.

München, den 10. März 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Wallner

Aktenzeichen: 197 07 971.7

Neue Deutsche Patentanmeldung

Anmelder: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr. R. Kurth

"Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive Zellen"

Unser Zeichen: 158-1

## Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive Zellen

Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektoren (Zell-Targeting-Vektoren), Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung zur Genübertragung in Zellen.

Der Ausdruck "retrovirale Vektoren" oder "retrovirale Transfervektoren" bezeichnet infektiöse aber vermehrungsunfähige Retroviren, die Gene in Form von retroviralen Expressionskonstrukten (auch Expressionsvektoren genannt) in Zellen einschleusen können. Die Genübertragung führt zur Integration des Expressionskonstrukts in das Genom der Zelle. Der retrovirale Gentransfer ist vorteilhaft, weil (i) in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in Zellen überführt wird, (ii) das Gen im allgemeinen ohne Mutationen oder Umlagerungen transferiert wird und (iii) ein stabiler chromosomaler Einbau erfolgt.

Es ist bekannt, retrovirale Vektoren auf der Basis des amphotropen murinen Leukämievirus (MLV) zu benutzen, um bestimmte Gene in Säugerzellen, speziell auch humane Zellen, zu überführen. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man zwei Komponenten.

Zum einen benötigt man eine Verpackungszelle, welche die gag-, pol- und env-Genprodukte des MLV durch Expression psi-negativer Konstrukte bereitstellt, so daß diese Gene nicht in ein Retrovirus verpackt werden können. Als "psi" wird das Verpackungssignal der Retroviren bezeichnet, daß die effiziente Verpackung der Boten-RNA steuert. Zum anderen ist ein sogenanntes Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in den retroviralen Vektor und den Transfer durch das Retrovirus erlaubt und das eine kodierende und übersetzungsfähige Region des gewünschten Genprodukts enthält. Somit muß das Expressionskonstrukt das Verpackungssignal psi enthalten. Die in der unbehandelten Verpackungszelle befindlichen gag-, pol- und env-Gene müssen psi-negativ sein, damit entsprechende Boten-RNA nicht in die Retroviruspartikel aufgenommen wird. Nach der Überführung des Expressionskonstrukts durch

Transfektion der entsprechenden Vektor-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Vektorpartikel in den Zellüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses Konstrukt, nicht jedoch die psi-negativen gag-, pol- und env-Gene, so daß diese nicht in Zielzellen überführt werden.

5

Der Tropismus der retroviralen Vektoren, d. h. die Auswahl der Säugerzellen, in welche diese das Expressionkonstrukt überführen können, wird durch das env-Gen in der benutzten Verpackungszelle bestimmt. Das env-Gen wird in Hüllproteine übersetzt, welche die äußere Hülle des retroviralen Vektors bilden. Die env-Genprodukte des amphotropen MLV, das bisher vor  
 10 allem für den Gentransfer benutzt wird, erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Speziell für den Gentransfer in humane Zellen erlaubt der amphotrope retrovirale Vektor nicht den selektiven Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger, weil das Empfängerprotein (Rezeptor) für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt amphotroper  
 15 retroviraler Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen zu finden ist.

Im Rahmen der Gentherapie steht zur Zeit die stabile Übertragung unterschiedlicher Gene in Zellkultur, d. h. "ex vivo", im Vordergrund. Verbesserungen der retroviralen Vektoren wurden bisher erreicht, indem statt des retroviralen env-Gens des MLV die env-Gene anderer Retroviren  
 20 in die Verpackungszelle eingebracht wurden. Beispielsweise wurden statt des MLV env-Gens die env-Gene des G-Proteins des "vesicular stomatitis virus (VSV)" (Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.-K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8033-8037) benutzt. Die resultierenden retroviralen Vektoren zeigten unter anderem eine erhöhte Stabilität. Auch der mögliche Einsatz der env-Gene des "simian sarcoma associated virus" (Takeuchi, Y.,  
 25 Simpson, G., Vile, R. G., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1992) *Virology* 186, 792-794), des "feline leukemia virus, subgroup B" (Porter, C. D., Collins, M. K., Taylor, C. S., Parkar, M. H., Cosset, F. L., Weiss, R. A. & Takeuchi, Y. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 913-919), des "feline endogenous virus RD114" (Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1995) *J. Virol.* 69, 7430-7436) und des "human T zell leukemia virus I (HTLV-I)" (Vile, R.  
 30 G., Schulz, T. F., Danos, O. F., Collins, M. K. & Weiss, R. A. (1991) *Virology* 180, 420-424) deutete sich in bestimmten Experimenten an. Versuche retrovirale Vektoren herzustellen, welche das env-Gen der Lentiviren HIV-1, HIV-2, "simian immunodeficiency virus (SIV)" oder des "human spuma retrovirus (HSRV)" enthielten, waren bisher nicht erfolgreich. Derartige retrovirale Vektoren würden die Kernproteine, codiert von der gag-Region, des MLV und die

Hüllproteine, codiert von der env-Region, eines anderen Retrovirus, beispielsweise des HIV, enthalten. Für den selektiven Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen stehen bisher keine Vektoren zur Verfügung. Der vorliegenden Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, retrovirale Vektoren in Formen bereitzustellen, die nicht den amphotropen Rezeptor der Säugerzellen sondern andere nur in bestimmten Geweben und Zelltypen exprimierte Rezeptoren ansteuern. Diese Vektoren sind für eine spezifische Genübertragung in ausgewählte Zelltypen geeignet. Eine weitere Aufgabe ist es, ein Verfahren zur Herstellung solcher retroviralen Vektoren zu entwickeln.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung retroviraler Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß die Viruskern von murinen Leukämievirus (MLV) und die Virushüllen von menschlichen Immunschwächeviren (HIV), Spumavirus (HSRV) oder Affen-Immunschwächeviren (SIV) stammen, gelöst. Insbesondere sind die retroviralen Vektoren dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen vom menschlichen Immunschwächevirus 1 oder 2 (HIV-1, bzw. HIV-2) stammen. Besonders bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten. Insbesondere bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten, das durch den C-Terminus oder eines beliebigen Fragments des transmembranen Proteins des murinen Leukämievirus (MLV) oder eines anderen Retrovirus verlängert worden sind.

Weiterhin werden Verpackungszellen bereitgestellt, in denen das psi-negative Hüllproteingen (env) der Lentiviren HIV oder SIV oder des HSRV und die psi-negativen gag/pol-Gene des MLV exprimiert werden. Diese Verpackungszellen enthalten weiterhin psi-positive Expressionskonstrukte, welche mit Hilfe der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren übertragen werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung können Viruskern, die von einem definierten Retrovirus stammen, in Zusammenhang mit Expressionskonstrukten zur Herstellung der beschriebenen Zell-Targeting-Vektoren benutzt werden, die aufgrund ihrer Eigenschaften, hier aufgrund des Vorhandenseins des Verpackungssignals psi, in die Viruskern aufgenommen werden. Die Viruskern mit den zu übertragenden Expressionskonstrukten werden ummantelt von fremden Virushüllen, die von einem anderen Virustyp oder aus einer anderen Zelle stammen. Die

Expressionskonstrukte werden dann mit Hilfe der retroviralen Vektoren übertragen. Der Einbau der fremden Virushülle kann durch die Verwendung der verkürzten Form des transmembranen Hüllproteins des HIV-1 env-Gens pTr712 vermittelt werden. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Vollängen-Transmembranproteine oder durch Anhängen eines Anteils des

5 Gens, welches zur Bildung der Viruskern führt, an die verkürzten oder an die Transmembranproteine, in die Vektoren aufgenommen werden. Besonders bevorzugt für solche Vektoren sind MLV abgeleitete Kapsidpartikel, welche die Hüllproteine anderer Retroviren, insbesondere anderer Lentiviren wie HIV oder SIV oder des humanen Spuma-Retrovirus (HSRV) enthalten. Diese Vektoren infizieren den gewünschten Zelltyp über den zellulären Rezeptor des

10 Virus, von welchem die fremde Hülle abstammt.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform wird eine beliebige Zelle mit einem psi-negativen Expressionsgen für gag- und pol-Gene transfiziert. Ferner kann die Zelle mit einem Expressionskonstrukt, umfassend ein psi-Verpackungssignal und die in eine Zielzelle zu

15 überführende genetische Information, transfiziert werden. Die Zelle wird dann mit einem weiteren Expressionsgen, das die genetische Information für fremde Hüllproteine enthält, transfiziert. Die so hergestellte Zelllinie produziert retrovirale Vektoren, enthaltend die zu überführende genetische Information.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform wird die MLV-env-negative Verpackungszelllinie TELCeB6 (Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1995) *J. Virol.* 69, 7430-7436) mit dem verkürzten env-Gen pTr712 des Plasmids pLbAc/env-Tr712-neo (Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) *Virology* 189, 167-177; Kräusslich, H.-G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.-M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H. R., Bosch, V.

25 (1993) *Virology* 192, 605-617) transfiziert. Dabei entsteht eine Verpackungszelllinie, die die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren des Typs MLV (HIV-1) in den Zellkulturüberstand abgibt. Diese Vektoren enthalten Kapsidpartikel, die aufgrund der Expression des gag/pol-Gens des MLV in der Zelle entstehen, und Hüllproteine des HIV-1, welche durch die intrazelluläre Expression der verkürzten Fassung Tr712 des HIV env-Gens in die Vektorpartikel aufgenommen

30 werden. Die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten das Vollängen-Oberflächenprotein gp120-SU des HIV-1 und die verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins, dessen kodierender Anteil aufgrund eines Stopkodons (Position 712) entsteht. Im einzelnen wurde nachgewiesen, daß dies zur Herstellung retroviraler Vektoren für den selektiven Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen führte. CD4-positive, nicht jedoch CD4-negative Zellen zweier ansonsten identischer Linien

konnten mit den Vektoren spezifisch transduziert werden, d. h. das Expressionskonstruktgen wurde überführt. Die Transduktion wurde in Gegenwart von Antikörpern gehemmt, welche die Infektion mit HIV ebenfalls hemmen. Das Oberflächenhüllprotein des HIV wurde auf der Oberfläche der hergestellten Gentransfervektoren nachgewiesen.

5

Die vorliegende Erfindung eröffnet die folgenden Möglichkeiten:

- Gene in bestimmte Zellen selektiv zu überführen,
- 10 - Gene in CD4-positive Säugerzellen selektiv zu überführen,
- weitere Effizienzsteigerungen des Gentransfers durch Verbesserung der env-Genkonstrukte in vergleichbaren Verpackungszellen zu erreichen,
- Gentherapiestrategien zu entwickeln, für die ein selektiver Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen notwendig oder hilfreich erscheint,
- 15 - insbesondere Gentherapiestrategien zur Behandlung oder Prophylaxe der HIV-Infektion des Menschen zu entwickeln, in dem HIV-hemmende Gene, z.B. Antisensegene, RNA-Ködergene oder transdominant-negative mutante Gene des HIV oder anderer Lentiviren in bestimmte Zellen überführt werden,
- insbesondere Gentherapiestrategien zur Einführung von Genen in bestimmte Zellen zu entwickeln, zur Behandlung oder Prophylaxe von Erbkrankheiten, wie z.B. der ADA-Defizienz
- 20 oder anderen genetisch behandelbaren Krankheiten, bei denen die Einführung in bestimmte Zellen vorteilhaft ist, und
- den Eintritt von Lentiviren in Säugerzellen im Detail zu untersuchen.

25 Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung.

Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip der Übertragung von Genen mit Hilfe retroviraler Vektoren in Säugerzellen.

30 Abbildung 2 zeigt das Schema der Herstellung eines retroviralen Vektors (entnommen aus "Molecular Biotechnology", Principles and Applications of Recombinant DNA, B.R. Glick und J.J. Pasternak, ASM Press, Washington, D.C., 1994, Seite 411, und ins Deutsche übertragen).

Abbildung 3 zeigt schematisch einen allgemein anwendbaren Herstellungsweg für retrovirale

Vektoren (retroviraler Transfervektor) durch Transfektion einer zunächst Expressionskonstrukt-negativen Verpackungszelle mit einem Expressionskonstrukt, das aufgrund des Vorhandenseins des Verpackungssignals (hier: psi) das zu übertragende Gen (therapeutische Gensequenz) in die retroviralen Vektoren einschleust.

5

Abbildung 4 zeigt einen speziellen Herstellungsweg für retrovirale Vektoren des Typs MLV (HIV-1). Dargestellt sind das MLV-gag/pol-Expressionsgen und das psi-positive Expressionskonstrukt pMFGInsLacZ, welche von der MLV env-negativen Verpackungszelle TELCeB6 exprimiert werden. Die env-Genvariante des HIV-1 (Tr712), welche die für das  
10 Vollängenoberflächen-Hüllprotein gp120-SU und die verkürzte Version des transmembranen Hüllproteins ( $\Delta$ gp41-TM) kodierenden Regionen enthält, wird bei der Herstellung der MLV (HIV-1) Vektoren ebenfalls in dieser Zelle exprimiert.

Abbildung 5 zeigt den generellen Aufbau von viralen Vektoren, welche den Viruskern eines  
15 bestimmten Virus in Kombination mit der Virushülle eines anderen Virus enthalten am Beispiel der MLV (HIV-1) Vektoren.

Die Herstellung von MLV (HIV-1) Vektoren der Erfindung wird nachfolgend näher erläutert. Zunächst wird eine DNA hergestellt, welche die Bildung der notwendigen Proteine induziert, die  
20 zur Formierung von Viruskernen in der Lage sind. Die DNA wird in eine humane Wirtszelle transferiert und dort exprimiert. Die DNA enthält zusätzlich Operator-Elemente, die zur Expression der DNA-Sequenzen erforderlich sind, welche die Bildung der Viruskern induziert. In die so gewonnene Wirtszelle wird eine zweite DNA übertragen, die zur Bildung von Hüllproteinen führen, die nicht von dem Virus stammen, von welchem die Viruskern stammen.  
25 Danach wird eine weitere DNA eingebracht, die von den Viruskernen verpackt wird und Sequenzen enthält, welche zur Bildung der gewünschten Proteine in der Zelle führen, in die mit Hilfe des retroviralen Vektors relevante Gene übertragen werden sollen.

Die DNA, welche zur Expression der Vektorhüllproteine führt, kann vorzugsweise vom env-Gen  
30 des HIV-1, HIV-2, des SIV, anderer HIV oder von HSRV stammen. Die verwendeten env-Gene können der Originalversion der genannten Viren entsprechen oder verkürzte Formen dieser env-Gene oder sogar modifizierte Formen dieser env-Gene sein. Das besonders bevorzugte HIV-1 env-Gen-pTr712 führt zur Bildung eines Vollängen-Oberflächenproteins gp120-SU und eines verkürzten Transmembranproteins. Das Transmembranprotein kann auch z. B. durch das

Anhängen der C-terminalen Domäne oder eines beliebigen anderen Fragments des Transmembranproteins des MLV oder eines anderen Virus modifiziert sein. Beispielsweise kann bei Verwendung von MLV Kapsidpartikeln der C-Terminus des Transmembranproteins des MLV anstelle des C-Terminus des HIV-1 env-Gens verwendet werden. Dabei kann die Spaltstelle des C-terminalen p2 Peptids modifiziert sein oder nicht.

Die genannten erfindungsgemäßen viralen Vektoren können zur Übertragung von Genen in bestimmte Zelltypen verwendet werden. Beispielsweise übertragen die erfindungsgemäßen MLV (HIV-1) Vektoren Gene speziell in CD4-positive Zellen. Diese Vektoren besitzen somit den Tropismus des HIV-1, dessen Hüllproteine sie enthalten. Bei der Verwendung anderer Hüllproteine können Gene in andere Zelltypen, beispielsweise in Blutstammzellen eingeschleust werden.

15

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

#### Zelllinien und Plasmide

Alle verwendeten Plasmide wurden aus transformierten *E. coli* des Stammes DH10 $\alpha$  oder HB101 präpariert. Die molekulare Klonierung der Expressionskonstrukte pL $\beta$ Ac/env-neo ist in Kräusslich, H.-G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.-M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H. R., Bosch, V. (1993) *Virology* 192, 605-617 und pLssAc/env-Tr712-neo ist in Kräusslich, H.-G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.-M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H. R., Bosch, V. (1993) *Virology* 192, 605-617 und Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) *Virology*. 189, 167-177 offenbart. Diese Expressionskonstrukte kodieren die HIV-1 env-Gen Varianten und das Neomycin-Resistenzgen. Das Expressionskonstrukt pCRUCA, welches das env Gen des amphotropen MLV beinhaltet, wurde in Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) *Virology*. 189, 167-177 und Battini, J.-L., Heard, J.-M. & Danos, O. (1992) *J. Virol.* 66, 1468-1475 offenbart.

Die TELCeB6 Verpackungszelllinie, welche das retrovirale Expressionskonstrukt MFG-nlsLacZ sowie die Gene gag und pol des MLV exprimiert, wurde in Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1995) *J. Virol.* 69, 7430-7436 offenbart. Die HeLa-CD4+ Zellen wurden über das MRC AIDS Programm Reagents Project bezogen, die 293-Zellen wurden von ATCC (ATCC CRL 1573) bezogen. Alle adhärennten Zellen wurden in Dulbeccos Modified



Eagles Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) in Gegenwart von 10 % fetalem Kälberserum gehalten. Die humane T-Zelllinie Molt 4 wurde in RPMI-1640-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (GIBCO/BRL, D-Eggenstein) propagiert. Die Transfektion der Verpackungszelllinie TELCeB6 mit dem Expressionskonstrukt pTr712 wurde mittels

5 Lipofektamin (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Transfektion des Plasmids pREP4 (Invitrogen, Leek, Niederland) wurde die Hygromycin-Selektion in Gegenwart von 200 mg/ml Hygromycin B (Sigman, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt. Einer der daraus hervorgegangenen Klone stellt die Zelllinie TELCeB6/pTr712-K14 dar.

10

#### Virale Infektion, Bestimmung von Titern und Neutralisationsexperimente

Die adhärenenten Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung oder in 6-Well-Platten in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausgesäht.

15 Die Molt 4 Zellen wurden in 6-Well-Platten in einer Dichte von  $8 \times 10^5$  ausgesäht. Vor der Infektion wurden die Zellen über Nacht in Zellmedium inkubiert. Zur Infektionen wurden die Zielzellen für drei Stunden mit 1 ml verdünnten oder unverdünnten Retroviruspartikel-enthaltenden Überständen koinkubiert. Die Virionen enthaltenden Überstände wurden vorher durch einen 0,45 mm-Filter passagiert, um die kontaminierenden Zellen zu entfernen. Zwei Tage

20 nach der Infektion wurden die Zielzellen mittels x-Gal-Test auf  $\beta$ -Gal-Expression untersucht. Die viralen Titer wurden wie beschrieben bestimmt. Die Titer sind in Kolonie formenden Einheiten pro ml angegeben (*colony forming units*, cfu). Zur Neutralisation der pseudotypisierten Vektoren wurde Serum eines HIV-1 infizierten Spenders eingesetzt.

#### 25 Immunanfärbung der Tranfektanden

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit eiskaltem Methanol inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde eine Stunde lang Blockierungspuffer (PBS/ 2 % BSA) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschliessend mit einer

30 1:1000 verdünnten anti-HIV-1 Serumlösung für 1 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit Peroxidase-gekoppeltem Protein G (Bio-Rad, Krefeld, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden die antigenpräsentierenden Zellen durch Zugabe von Substratpuffer (H202 mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angefärbt.

### Wester-Blot-Analyse

Die Herstellung der Zelllysate und die Durchführung der Western-Blots wurden nach üblichen Verfahren hergestellt. Die Viruspartikel in den Überstaenden der Verpackungszellen wurden mit  
5 Hilfe von Ultrazentrifugation (45 min bei 45.000 upm und 40°C) aufkonzentriert. Die Zentrifugate wurden in Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse wurde unter der Verwendung eines Ziegenserums gegen HIV-1 gp120-SU und Peroxidase-gekoppeltem Protein G durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektionskit (Amersham, Braunschweig,  
10 Deutschland) nachgewiesen.

### Membranfusionseigenschaft des HIV-1 Hüllproteins

Eine subkonfluente Kultur der Verpackungszelllinie TELCeB6/pTr712-K14 wurde mit Jurkat-  
15 Zellen ueberschichtet, für 48 h propagiert und anschließend photographiert.

## Patentansprüche

- 1) Retrovirale Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß die Viruskern e vom murinen Leukämievirus (MLV) und die Virushüllen von menschlichen Immunschwäheviren (HIV), Spumavirus (HSRV) oder Affen-Immunschwäheviren (STV) stammen.
- 2) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen vom menschlichen Immunschwähevirus 1 oder 2 (HIV-1, bzw. hiv-2) stammen.
- 3) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten.
- 4) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten, das durch den C-Terminus oder ein beliebiges Fragment des transmembranen Proteins des murinen Leukämievirus (MLV) oder eines anderen Retrovirus verlängert worden ist.
- 5) Verfahren zur Herstellung von Verpackungszellen, die retrovirale Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 bilden, umfassend das Transfizieren einer Verpackungszelle (gag-, pol- und Expressionskonstrukt-positiv), die vom MLV stammende Hüllproteine produziert oder nicht produziert (env-negativ), mit einem Expressionsgen, das die genetische Information für Hüllproteine enthält (env-positiv).
- 6) Verfahren zur Herstellung von Verpackungszellen, die retrovirale Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 bilden, umfassend das Transfizieren einer Zelle mit Expressionsgenen für gag und pol, und/oder einem Expressionskonstrukt, umfassend ein Verpackungssignal und die zu überführende genetische Information, und einem Expressionsgen, das die genetische Information für Hüllproteine enthält.
- 7) Verfahren nach Anspruch 5, wobei als MLV-env-negative Verpackungszelle die Zelllinie TELCeB6 verwendet wird.

8) Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei als env-Expressionsgen pL $\beta$ Ac/env-Tr712-neo verwendet wird.

9) Verpackungszellen, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8.

5

10) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Überführung von Genen in Zellen.

10

11) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Überführung von Genen in CD4-positive Zellen.

12) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung von Vektoren für die gentechnische Modifizierung von Zellen oder eines Wirkstoffs im Rahmen der Gentherapie.

### Zusammenfassung

- Beschrieben ist die Herstellung und Verwendung neuer retroviraler Vektoren für zelltypspezifischen Gentransfer, insbesondere ein Herstellungsverfahren von retroviralen
- 5 Vektoren, die Kapsidpartikel des murinen Leukämievirus (MLV) und Hüllproteine des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) enthalten. Diese Vektoren können für die Genübertragung in ausgewählte Zelltypen, speziell in CD4-positive Säugerzellen verwendet werden.

# Genherapie mit retroviralen Genträgern

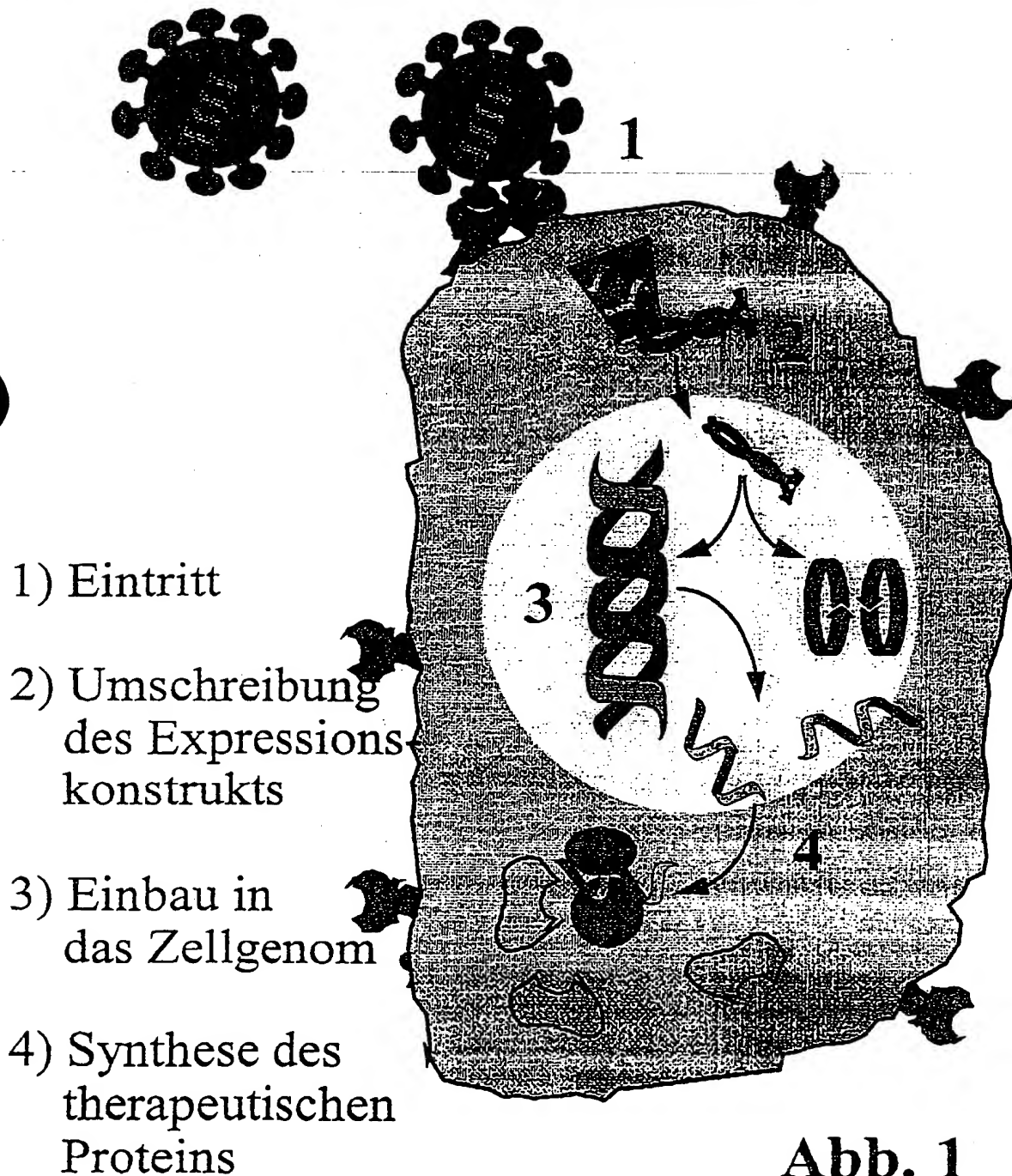


Abb. 1

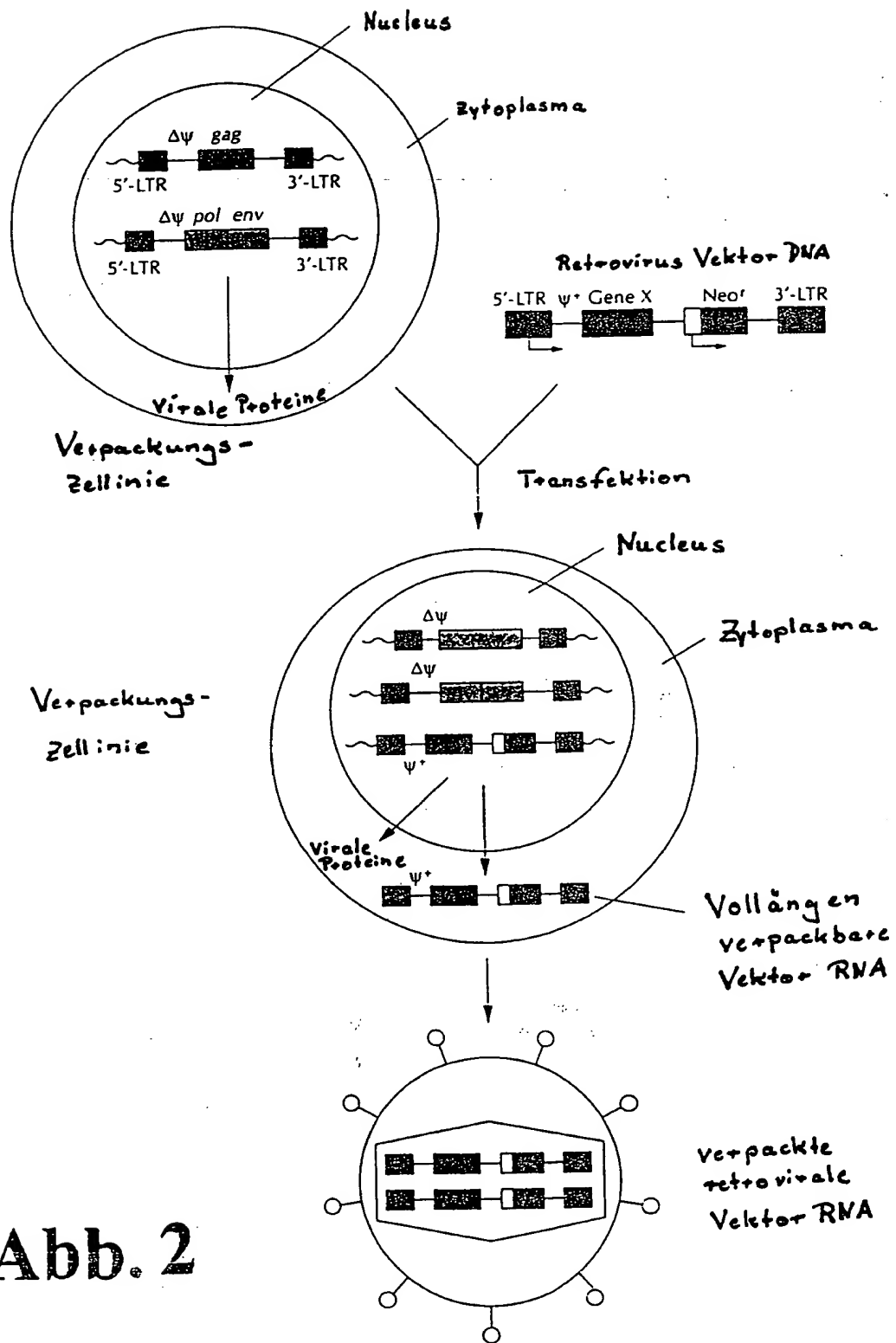
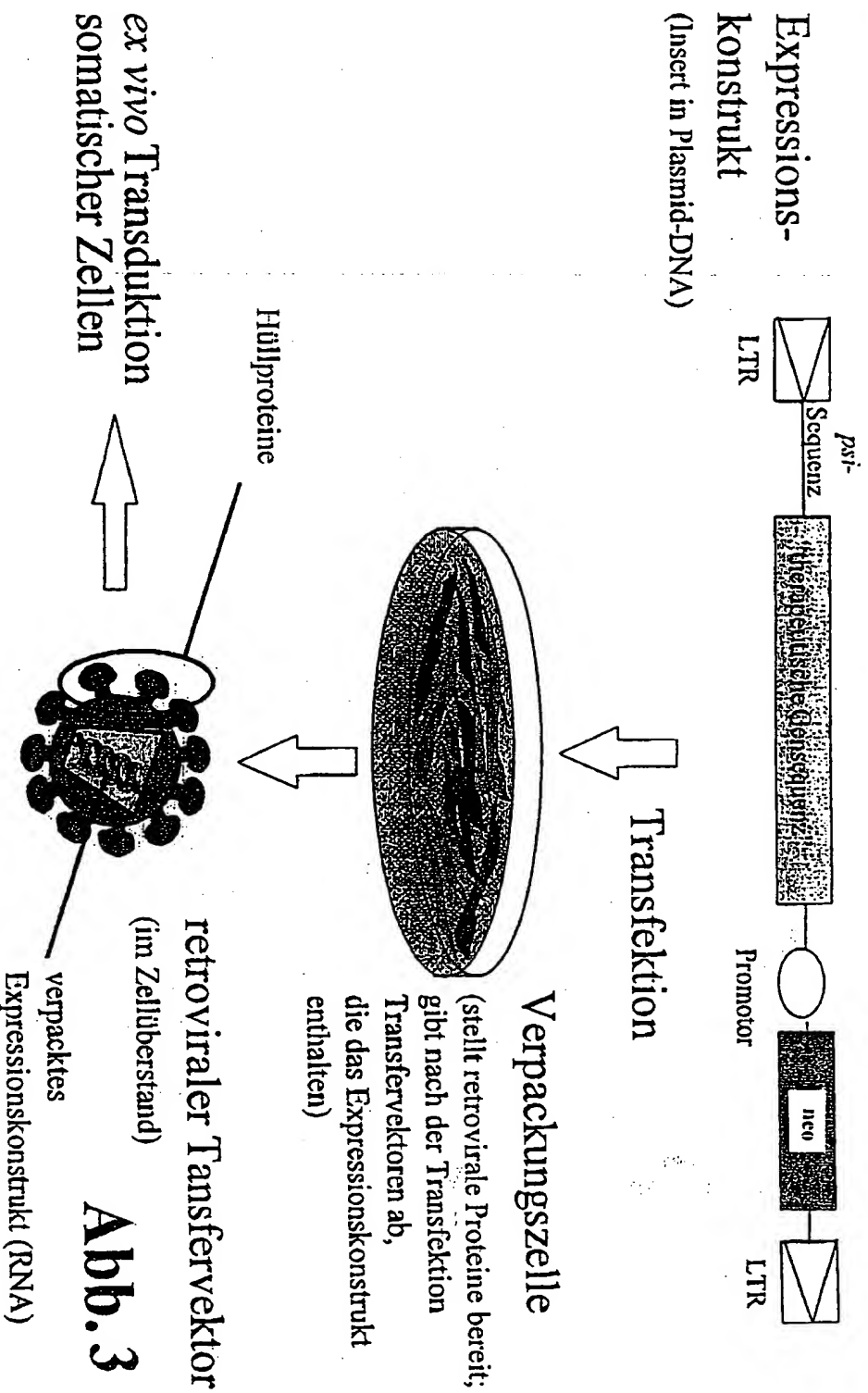


Abb. 2

# Erzeugung retroviraler Vektoren



**Abb. 3**



# Retrovirale Verpackungszelle

z. B. TE671 cells: human medulloblastoma

+

Expressionsgene für *gag* und *pol* des MLV,  
die nicht verpackt werden



+

**pMFGlnsLacZ**

Expressionskonstrukt für *lacZ*,  
das verpackt wird



+

*env*-Genvariante des HIV-1,  
die ein verkürztes Transmembranprotein  
exprimiert



**Δ gp41-TM**

Fusions- Membran-  
peptid region



Stopkodon statt Aminosäure 712

Abb. 4

## Aufbau retroviraler Vektoren mit Fremd-Hüllproteinen des HIV



Hüllproteine des HIV-1:  
Vollängen-Oberflächenprotein,  
verkürztes Transmembranprotein

Kapsidproteine (*gag*-Genprodukte)  
und *pol*-Genprodukte  
des MLV:

Kapsidpartikel, die Expressionskonstrukte  
des MLV mit MLV-psi-Sequenz  
verpacken und dieses Gen in Zellen  
überführen (Gentransfer)

Verpackte Expressionskonstrukte  
mit MLV-psi-Sequenz

Abb. 5